



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CAMPUS PROFESSOR ANTÔNIO GARCIA FILHO  
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ANANDA RESENDE DA MATA

**CINÉTICA DA PRESENÇA DE VASOS SANGUÍNEOS NO  
PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM  
CAMUNDONGOS**

LAGARTO

SETEMBRO 2018

ANANDA RESENDE DA MATA

**CINÉTICA DA PRESENÇA DE VASOS SANGUÍNEOS NO PROCESSO DE  
REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso/  
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Sergipe, Campus  
Professor Antônio Garcia Filho, como exigência  
para a obtenção do Diploma de Graduação em  
Odontologia.

**Orientador:** Dr. Carlos Eduardo Palanch Repeke

LAGARTO-SE

2018

ANANDA RESENDE DA MATA

**CINÉTICA DA PRESENÇA DE VASOS SANGUÍNEOS NO PROCESSO DE  
REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Sergipe, Campus  
Professor Antônio Garcia Filho, como exigência  
para a obtenção do Diploma de Graduação em  
Odontologia.

**Orientador:** Dr. Carlos Eduardo Palanch Repeke

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Luiz Alves de Oliveira Neto

---

Prof. Dra. Claudia Cristina Kaiser Pinto

---

Orientador – Prof. Dr. Carlos Eduardo Palanch Repeke

*Dedico este trabalho a Deus por toda sua benevolência e pelos seus grandes feitos em minha vida. Pois tudo o que é verdadeiro, tudo o que é honesto, tudo o que é justo, tudo o que é puro, tudo o que é amável, tudo o que é de boa forma, se há alguma virtude, se há algum louvor, devo ao meu Deus.*

## **Agradecimentos**

A **UFS** pela excelência de ensino

A **FOB-USP** por ceder o laboratório para pesquisa.

Ao professor, orientador e amigo **Repeke** que teve papel fundamental em minha vida acadêmica e por me inspirar a buscar e compreender os fascínios da imunologia.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação em especial aos grandes mestres: **Prof. Luiz Neto, Prof.<sup>a</sup> Flavia Márcia**. Obrigado pelo ensinamento e exemplo ao longo desta jornada.

A minha família, em especial minha **mãe Nailde**, agradeço as orações, os conselhos, todo carinho, amor, dedicação e confiança. Serei eternamente grata por ser meu porto seguro.

Ao meu companheiro de estudos **Marcos Filho**, eterno amigo e meu grande amor.

Aos grandes **amigos** conquistados na Universidade em especial a **Rafaela, Jamile, Ayla, Ana Luiza** e as **jambalaias de casa Juliana e Kaisa**. Vocês tornaram esses anos mais divertidos e harmônicos.

Muito obrigado!

## ***EPÍGRAFE***

*“Não importa o que aconteça, continue a nadar, continue a nadar,  
continue a nadar”.*

*(Walters, Graham; **PROCURANDO NEMO**, 2003).*

## **RESUMO**

### **CINÉTICA DA PRESENÇA DE VASOS SANGUÍNEOS NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS**

Ananda Resende da Mata, Lagarto, 2018.

O processo de reparo ósseo é uma reação tecidual dinâmica, que apresenta diferentes etapas, tais como: inflamação, proliferação celular e a síntese de elementos da matriz extracelular. Dentre as possíveis estratégias para otimização terapêutica do reparo ósseo alveolar, podemos destacar a modulação na presença e formação de vasos sanguíneos, que se mostra extremamente importante ao processo de reparo ósseo, cujas cinética ainda não são profundamente compreendidas. O objetivo desse estudo foi analisar a cinética da presença de vasos sanguíneos e correlacionar com a presença de coágulo e matriz óssea e a sua importância no processo de reparo ósseo alveolar bem como avaliar o pool de vegf a partir de PCR. A pesquisa partiu da confecção e análise histológica das lâminas com intuito de verificar diferentes células, estruturas e tecidos histológicos. Como resultado obtivemos formação de coágulo no período de 0 hora, presença de neovascularização no 7º dia, houve um preenchimento ósseo parcial da porção central do alvéolo no período de 14 dias e por fim aos 21 dias ocorreu o reparo do alvéolo dental. Conclui-se que ocorreu uma ligação direta entre os fenômenos angiogênicos na resposta imune e quimiotática em uma condição de reparo de tecido ósseo.

**Palavras chaves:** Fisiologia; Osteogênese; Alvéolo Dental; Camundongos.

## **ABSTRACT**

### **KINETICS OF THE PRESENCE OF BLOOD VESSELS IN THE PROCESS OF ALVEOLAR BONE REPAIR IN MICE**

Ananda Resende da Mata, Lagarto, 2018.

Bone repair is a dynamic tissue reaction, which presents different steps, such as: inflammation, cell proliferation and synthesis of extracellular matrix. Among the possible strategies for therapeutic of alveolar bone repair, we can highlight the modulation in the presence and formation of blood vessels, which is extremely important to the process of bone repair, whose kinetics are not yet deeply understood. The present study aims to analyze the kinetics of blood vessels and to correlate it with the volume of clot and bone tissue. The study consists in preparation and histological analysis to verify different histological cells, structures and tissues. As a result we obtained a clot formation in the 0 hour period, presence of neovascularization on the 7th day, a partial bone filling of the central portion of the alveolus in the period of 14 days and finally the repair of the dental alveolus. In this way, this research verified a direct connection between the angiogenic phenomena in the immune and chemotactic response in a condition of bone tissue repair.

**Keywords:** Angiogenesis; Bone repair; Dental Alveolus; Mice.



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS SÍMBOLOS

---

%	Por cento
Ang.	Angiopoetinas
C57Bl/6-WT	Camundongo 57 black/6 (normal)
CEEPa	Comissão de Ética em Pesquisa em Animais
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
CXCL1	Quimiocina 1
CXCL10	Quimiocina 10
CYR61	Indutor Angiogénico Rico em Cisteína 61
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamino
Et al.,	Colaboradores
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FOB-USP	Faculdade de Odontologia de Bauru/ São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Pi	Número irracional que representa a divisão entre o perímetro duma circunferência e o seu diâmetro, com o valor aproximado de 3,14159265359.
PLGF	Fator de Crescimento Placentário
Pool	Somatória
TGF	Fator de crescimento e transformação
TIE2	Receptor tirosina quinases
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WT	Camundongo normal, sem alteração “tipo selvagem”.
$\Sigma$	Sigma
RPM	Rotações por minuto
RNAse	Ribonuclease
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ct	Ciclo limiar
$\beta$	Símbolo Grego BETA
$\alpha$	Símbolo Grego Alpha

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de literatura.....</b>	<b>13</b>
	2.1 Processo de reparo alveolar .....	13
<b>3</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>19</b>
	3.1 Animais de experimentação .....	19
	3.2 Procedimentos Histotécnicos .....	19
	3.3 Procedimentos histológicos, análise morfológica e histomorfométrica ...	20
	3.4 Análise Molecular.....	22
	3.5 Extrações de RNA e Transcrição Reversa.....	22
	3.6 Reações de PCR Array .....	23
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>25</b>
	4.1 Análise histológica descritiva do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos.....	25
	4.2 Análise histomorfométrica comparativa do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos .....	26
	4.3 Resultados das reações de PCR em tempo real .....	29
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Após lesões ou perda de tecido ósseo, o adequado desenvolvimento do processo de reparo e neoformação óssea são fundamentais para o restabelecimento da homeostasia tecidual e recuperação de suas funções, ou para possibilitar terapias reabilitadoras. Nesse contexto, diversas frentes de estudos têm tentado potencializar o processo de formação e reparo ósseo, envolvendo desde estudos com variados biomateriais até estudos focados na interação entre células ósseas e mediadores envolvidos na reposta inflamatória e imunológica (BIRN, 1973). Embora o balanço entre a formação óssea e a resposta inflamatória mostre-se extremamente importante, tal interação permanece pouco compreendida.

Enquanto uma resposta imune e inflamatória exacerbada caracteristicamente está associada à reabsorção óssea, estudos demonstram que a inibição da resposta imune/inflamatória com anti-inflamatórios, influenciam de forma negativa os processos de reparo ósseo e osseointegração (JACOBSSON *et al.*, 1994.; KALYVAS; DG, 2008). A grande maioria dos estudos disponíveis na literatura têm se concentrado na influência de células e mediadores imunológicos na ativação de osteoclastos e no processo de reabsorção óssea, entretanto, não se sabe exatamente quando é realmente necessária a modulação da resposta imune e inflamatória, uma vez que dependendo do tipo e intensidade da resposta seu impacto no tecido ósseo pode variar significativamente.

Buscando modular a presença das células ósseas em situações de resposta imune e inflamatória, inicialmente é importante compreendermos como ocorre a interação entre o sistema ósseo, o sistema imune e o sistema vascular. O tecido ósseo é um tecido mineralizado e extremamente dinâmico e vascularizado, que mesmo em homeostase, apresenta alta taxa de renovação. Basicamente esse tecido é formado por três tipos celulares, os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, que em conjunto são responsáveis pela sua constante remodelação deste tecido, em ciclos de reabsorção e deposição óssea, um processo chamado de "*couple bone formation*" (TAKAYANAGI, H. 2003).

Uma vez que o osteoblasto e o osteoclasto atuem de forma direta na formação e reabsorção óssea, a presença de vasos sanguíneos demonstra um papel fundamental na migração das células progenitoras do tecido ósseo (TAZIMA *et al.*, 2008). Quando um tecido novo é formado, no caso o tecido ósseo, é vital o fluxo sanguíneo para seu crescimento e subsistência. Para que ocorra a migração das células endoteliais e o desenvolvimento de novos capilares de estrutura tubular há dependência não só das células e citocinas presentes, mas também de uma produção e organização dos componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno, vitronectina, tenascina e laminina, tanto no tecido de granulação quanto na membrana endotelial basal (LEFKOVITS *et al.*, 1995; WAGNER *et al.*, 1996).

A matriz extracelular é importante para o crescimento e manutenção normal dos vasos, pois, além de agir como “plataforma” que dá suporte à migração celular, age também como reservatório e modulador da liberação de fatores de crescimento. A proliferação das células endoteliais adjacentes e dentro da ferida leva à deposição, de forma transitória, de grandes quantidades de fibronectina na parede do vaso. Assim, a angiogênese requer a expressão de receptores para fibronectina pelas células endoteliais, organizando a fibronectina como um canal, de modo a permitir o movimento das células endoteliais (WU *et al.*, 2013). No entanto, no caso específico do reparo ósseo alvéolo íntegro em que a neoformação óssea não é precedida pela formação de um tecido cartilaginoso, o estímulo para desencadear a angiogênese ainda não está completamente estabelecido.

Desta forma, torna-se importante o conhecimento aprofundado do fenômeno angiogênico e sua importância na modulação da resposta imune em condição de reparo do tecido em alvéolo íntegro. O presente estudo tem como objetivo analisar a cinética dos vasos sanguíneos, coágulo, matriz óssea e avaliar o pool de VEGF nos alvéolos dentários, bem como a influência da angiogênese no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros relatos realizados sobre o processo de reparo alveolar foram feitos por meio de descrições radiográficas e histológicas, utilizando alvéolos de cães. O processo de reparo alveolar é um conjunto de reações teciduais ocorridas no interior do alvéolo após a exodontia, com o objetivo de preencher o alvéolo com tecido neoformado (EULER, 1923; CARVALHO; OKAMOTO, 1987).

Com o advento do processo de reparo alveolar, estudos buscam identificar cronologicamente as reações teciduais em animais de laboratório. Entretanto, o cão, o macaco e o rato são os mais pesquisados. Apesar da variação cronológica no processo de reparo alveolar entre animais e homens, os eventos são semelhantes, sendo plausível definir as principais características comuns da histogênese do reparo (HUEBSCH *et al.*, 1952, AMLER, 1969; SIMPSON, 1969).

No processo de cicatrização ocorre uma coordenada cascata de eventos moleculares, celulares e bioquímicos que interagem entre si para que ocorra o reparo tecidual. Carrel em 1910 apresentou os mecanismos da cicatrização em ordem de eventos os quais foram divididos posteriormente em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelamento da ferida (ORGILL; DEMLING, 1988; CARREL, 1910). Recentemente, Clark (2005) apresentou esse processo em três fases divididas, didaticamente, em: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelamento ou de maturação.

### 2.1 Processo de reparo alveolar

#### ***Fase inflamatória***

Após a lesão os eventos iniciais do reparo estão voltados ao tamponamento dos vasos, ocorrendo à liberação de tromboxana A<sub>2</sub> e prostaglandinas pelas membranas celulares, permitindo que ocorra uma vasoconstricção. Com a injúria ao tecido ocorre uma deposição de plaquetas resultando em um trombo, a adesão inicial das plaquetas à superfície lesada

ocorre pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana. As principais delas são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Esse receptor possui sítios de ligação para o fibrinogênio, fator de von Willebrand, vitronectina, fibronectina e trombospondina (LEFKOVITS *et al.*, 1995; WAGNER *et al.*, 1996). Visando a hemostasia e iniciando a cascata de eventos com ativação das plaquetas e liberação de grânulos e fatores de crescimento que favorecem a agregação plaquetária. Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas, como: TGF- $\beta$ , PDGF, tromboxanos e PAF promovem um gradiente quimiotático e contribuem para a reposta inflamatória visando uma vasodilatação que permitirá maior permeabilidade vascular, com influxo de neutrófilos (DYSON, 1990).

As primeiras células a chegarem à ferida são os neutrófilos, em uma concentração maior por volta de 24 horas após a lesão, eles aderem à parede do endotélio por meio das selectinas e paulatinamente são substituídos por macrófagos, esse desempenham função importante, como; secreção de citocinas, fatores de crescimento e colabora para o processo angiogênico, fibroplasia e síntese da matriz extracelular, tendo grande influência na transição para fase proliferativa (BROUGHTONET *et al.*, 2006).

### ***Fase proliferativa***

Após as 24 horas ocorrem à organização do colágeno sanguíneo, com invasão de fibroblastos originando-se o processo de fibroplasia, com formação do tecido de granulação o qual preencherá todo o alvéolo e que está suportado por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipo I e II (SIMPSON, 1969; JOHANSEN, 1970; GUIDUGLI-NETO, 1992; LIN; MCCULLOCH; CHO, 1994). Ao mesmo tempo, ocorre a proliferação de células endoteliais, originando novos vasos sanguíneos, que é de essencial importância, pois permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (ECKERSLEY; DUDLEY, 1988). A fase proliferativa é subdivida em três eventos: neo-angiogênese, fibroplasia, e epitelização (TAZIMA *et al.*, 2008).

**Neo-angiogênese:** é o processo de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, seguindo algumas

sequências como: vasodilatação e aumento da permeabilidade induzida pelo VEGF, separação dos pericitos da superfície abluminal, com migração de células endoteliais para área lesada, conformação em tubos capilares, recrutamento de células periendothelias para formação de um vaso maduro e supressão da proliferação e migração endotelial e deposição de membrana basal (KUMAR, V. *et al.*, 2013).

### ***Papel do VEGF-A, FGF-2, CTGF, CYR61, Angiopoetinas, GRO- $\alpha$ , IP-10 na angiogênese***

A família do VEGF inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFE e o PLGF. O VEGF-A foi identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento (GALE, YANCOPOULOS, 1999). Ele promove vasodilatação por estímulo da produção de NO e contribui para formação do lúmen vascular. O VEGF além de induzir a mitose das células endoteliais pode atuar inibindo apoptose das mesmas, o VEGF aumenta a quantidade de MMP, degradando a matriz extracelular possibilitando maior facilidade de penetração de vasos neoformados, possuindo também efeito pró-inflamatório, neuroprotetor e atua na estabilização e remodelação vascular (CULLINAN-BOVE, KOOS, 1993; CONTRAN, 1996; BROWN, 1997; FERRARA, 2000).

O FGF-2 atua na angiogênese estimulando a proliferação de células endoteliais e propicia a migração de macrófagos e fibroblastos para área lesada (RISAU, 1990).

As *angiopoetinas* *Ang1* e *Ang2* são fatores de crescimento que atuam na angiogênese e na maturação estrutural de novos vasos sanguíneos por meio da interação com receptores Tie2 (KUMAR, V. *et al.*, 2013).

Recentemente foi identificado que CTGF juntamente com a CYR61 promovem, *in vitro*, a migração e sobrevivência de células endoteliais e *in vivo* desencadeia a angiogênese (HUTSON *et al.*, 1979; BABIC *et al.*, 1998; BABIC *et al.*, 1999).

As quimiocinas CXCL1, CXCL10 demonstram influência sob o processo angiogênico, sendo que a primeira atua por meio de ação indutora já a segunda inibidora respectivamente. A CXCL1 está presente no início da

inflamação tem função de quimiotaxia e exerce um papel especial na migração de queratinócitos. Já o CXCL10 está presente nos casos de inflamação crônica (ENGELHARDT *et al.*, 1998).

### ***Fibroplasia***

Os fibroblastos só aparecem no local da lesão a partir do terceiro dia, depois que as células polimorfonucleares já fizeram a limpeza da área, esses são oriundos de células mesenquimais, e tem como função a deposição de MEC e sintetizar colágeno. A produção de colágeno depende da oxigenação das células, hidroxilação da prolina e lisina, reação essa mediada pelo próprio fibroblasto em presença de co-enzimas: vitaminas A, C e E, ferro, testosterona, tiroxina, proteínas e zinco. Em meados a quarta semana ocorre um equilíbrio e maturação do colágeno (TAZIMA, 2008).

### ***Fatores de crescimento envolvidos na deposição de MEC e formação da cicatriz***

Os TGF-  $\beta$  1, TGF-  $\beta$  2, TGF-  $\beta$  3, são mitogênicos para fibroblastos e estimula a produção de colágeno, fibronectina e proteoglicanos, e inibe a degradação do colágeno com a diminuição da proteinase aumento dos TIMPs. O TGF-  $\beta$  é uma citocina que atua como limitadora para resposta final da inflamação (KUMAR, V. *et al.*, 2013).

O PDGF contribui na estimulação de fibroblastos para a produção de matriz extracelular, estimula a sua proliferação e induz nestas células a sua mudança de fenótipo para miofibroblastos (CLARK, 1993; CHOI *et al.*, 1996; HELDIN; WESTERMARK, 1999).

### ***Epitelização***

Nas primeiras 24 a 36 horas após a lesão, fatores de crescimento epidérmicos estimulam a proliferação de células do epitélio. Na pele os ceratinócitos são capazes de sintetizar diversas citocinas que estimulam a cicatrização das feridas cutâneas (TAZIMA, 2008).



### ***Fase de Maturação***

Por volta da 3ª semana ocorre a maturação da ferida que caracteriza-se por um aumento da resistência, sem aumento na quantidade de colágeno. Há um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno neste período, por ação da collagenase (TAZIMA, 2008).

Após três meses a força tênsil é recuperada em 80% e, mesmo após um ano a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã, e a força tênsil jamais retornará a 100% (BROUGHTON *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2007).

### ***Tecido ósseo***

Os osteoblastos são as células produtoras de matéria orgânica do osso. O osso alveolar consiste em uma matriz calcificada com osteócitos aprisionados em lacunas. Os prolongamentos dos osteócitos ficam nos canalículos. Os canalículos formam um sistema de anastomoses, trazendo oxigênio e nutrientes para os osteócitos através do sangue e removendo os produtos residuais do metabolismo. Os sistemas haversianos são o mecanismo interno que traz suprimento vascular para os ossos mais espessos para receber suprimento apenas por vasos da superfície. Os compostos inorgânicos consistem em cálcio e fosfato, carbonatos, citratos e hidroxilas. Os sais minerais aparecem sob a forma de cristais de hidroxiapatita. A matriz orgânica é formada principalmente por colágeno tipo I (90%). O osso é a principal fonte de cálcio do organismo, quando seus níveis no sangue diminuem (CARRANZA, *et al.*, 2012).

A partir do quarto dia, os osteoblastos formados a partir de células osteoprogenitoras, depositam matriz extracelular, formando um tecido osteóide. Tanto a formação do tecido de granulação quanto formação de tecido osteóide utilizam restos epiteliais de Malassez (CARVALHO; OKAMOTO, 1987).

A atividade osteogênica resulta em um tecido rico em células osteoblasticas. O tecido ósseo neoformado apresenta uma estrutura trabecular irregular com fibras de colágeno desorganizadas e uma alta concentração de osteoblastos e osteócitos e menor grau de mineralização. No processo de

osteogênese ocorre uma proliferação de osteoblasto na região central do alvéolo, à medida que esse processo progride o osso imaturo é substituído por osso lamelar “maduro” (OKAMOTO, 1987). Aos 21 dias, é possível verificar que o tecido ósseo preenchia todo o alvéolo e o periósteo retornara à sua forma normal (SMITH, 1974).

O reparo será considerado completo quando o alvéolo estiver completamente preenchido por tecido ósseo neoformado e quando a crista alveolar estiver remodelada, e apresente um equilíbrio nas atividades osteoclástico-osteoblástico e quando o novo osso estiver em condições para suportar novos estímulos, isso se dá em média por volta do sétimo mês “210 dias” (RUSSO, 1973; CARVALHO; OKAMOTO, 1987).

A fosfatase alcalina é uma enzima predominantemente encontrada na circulação, são a óssea, hepática e intestinal. Essa enzima está localizada na superfície externa da célula e são liberadas na circulação por meio da ação das fosfolipases C e D, sendo utilizada como marcador bioquímico de formação no metabolismo ósseo (VIEIRA, 1999; CARDOSO, 2009).

A osteocalcina é uma proteína que apresenta produção aumentada durante o período de mineralização, sendo um indicativo para formação óssea, presentes em maiores quantidades, no período de 6 a 8 semanas (TROMBELLI, *et al.*, 2008).

O processo de reparo ósseo é influenciado por vários fatores, sendo esses sistêmicos (falta de vitamina), condições metabólicas, circulatórias, hormonais e fatores locais como: trauma, tipo da ferida, resposta inflamatória e infecção (BIRN, 1973).

### **3 METODOLOGIA**

Este é um estudo do tipo experimental que recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Universidade de São Paulo, e encontra-se protocolado sob o N.º 007/2014.

#### **3.1 Animais de experimentação**

Foram utilizados 36 camundongos do tipo selvagem (C57Bl/6-WT) com idade aproximada de 8 semanas, cedidos pelo biotério da Universidade de São Paulo (USP). Somente camundongos machos foram utilizados para evitar a influência hormonal no processo de reparo alveolar. Os animais foram alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) e água *ad libitum*, com exceção das primeiras 24 horas pós-cirurgia, em que essa alimentação foi triturada. Os 36 animais foram analisados de acordo com os diferentes períodos pós exodontia (0 hora, 7, 14 e 21 dias). O número de animais, os tempos de análises e as atividades propostas, foram determinados de acordo com estudos prévios e experimentos piloto.

#### **3.2 Procedimentos Histotécnicos**

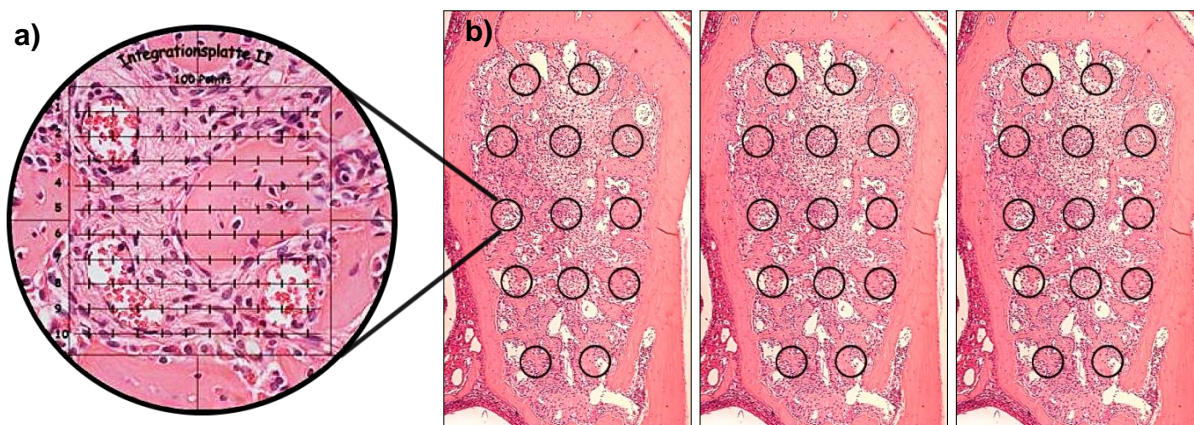
Esta pesquisa partiu da confecção histológica das lâminas e análise das diferentes células, estruturas e tecidos histológicos, além de conhecer o processo de reparo ósseo alveolar. Os camundongos já passaram pelos procedimentos cirúrgicos com a exodontia do incisivo superior direito e as amostras contendo os alvéolos foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas (pH 7,2), com acondicionamento em fixador alcóolico, as amostras foram lavadas em água corrente ("over-night") e desmineralizadas em solução de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) à temperatura ambiente, por um período aproximado de quarenta dias, respeitando as trocas semanais da solução desmineralizadora e monitoramento por meio da análise radiográfica. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas

visando à total remoção de EDTA, e em seguida submetidas à técnica de rotina para inclusão em parafina Histosec® (parafina + resina). Para inclusão, procedeu a desidratação das amostras em 3 banhos de soluções de etanol 100% (dois banhos por 4 horas, seguido de um banho de 12 horas). Em seguida as amostras desidratadas passaram por 3 banhos de 1 hora em soluções de xilol, e por fim foram incluídas em parafina para confecção dos blocos. Os blocos de parafina serão submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido transversal (perpendicular ao longo eixo do alvéolo dental), utilizando-se um micrótomo Leica Jung RM 2045. Todo o processo histológico foi realizado no laboratório de Histologia da Universidade Federal do Segipe (UFS).

### **3.3 Procedimentos histológicos, análise morfológica e histomorfométrica**

Para as análises histológicas descritiva (qualitativa) e histomorfométrica (quantitativa), foram obtidas 6 lâminas de cada animal, com 8 cortes semi-seriados em cada lâmina, os quais foram corados em HE para serem observados e analisados em microscópio óptico. As análises histológicas descritivas foram realizadas com emprego de um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2), sendo considerado o terço apical, médio e superficial do alvéolo dental dos diferentes períodos experimentais (0 hora, 7, 14 e 21 dias) para todos os grupos. Optou-se por uma descrição histológica qualitativa mais abrangente da evolução do processo de reparo alveolar em objetivas menores (4x e 10x), e uma análise descritiva mais detalhada em objetiva de aumento de 40x, acompanhando os eventos de reparação óssea conforme os seguintes eventos: Presença e reabsorção gradativa do coágulo sanguíneo; Presença de infiltrado inflamatório; Formação de tecido de granulação e sua transição para tecido conjuntivo, e deste para tecido ósseo neoformado; Processo de remodelação das trabéculas ósseas neoformadas (evidenciado pela presença de osteoclastos); Trabéculas ósseas já remodeladas, evidenciadas por linhas de reversão; Maturação do tecido ósseo neoformado, sugerida pela presença de tecido medular. A análise histomorfométrica foi realizada por meio da avaliação da densidade de área das estruturas constituintes do tecido alveolar durante o reparo, sendo

considerados os vasos sanguíneos, coágulo e osso. A densidade da área foi obtida por meio de contagem de pontos coincidentes sobre os critérios histológicos supracitados, com o emprego de uma lente ocular de compensação ZEISS kpl 8x (Carl-Zeiss Micro Imaging Inc.), contendo uma grade ou retículo de integração II ZEISS e uma objetiva de imersão com o aumento de 100x, em microscópio óptico binocular (JENAMED 2 (Carl-Zeiss)). O retículo de integração utilizado constitui uma grade composta por um quadrado que limita a área a ser estudada, e que contém um conjunto de 10 linhas paralelas sucessivas, divididas igualmente por 10 pontos, formando um sistema de 100 pontos (Figura 1a). Assim, a sobreposição do retículo sobre o campo histológico permitiu a contagem de estruturas que fossem coincidentes com os pontos do retículo, sendo considerados ao todo 13 campos microscópicos distintos, dispostos regular e sistematicamente sobre um único corte histológico. Para cada animal, foram considerados pelo menos 3 cortes histológicos abrangendo o terço médio do alvéolo, sendo portanto contados ao todo 39 campos, conforme demonstrado na (Figura 1b). Os campos foram escolhidos com intervalos regulares em cada corte, de maneira a se obter uma amostra representativa de toda área do corte (WEIBEL, 1969). O cálculo da densidade de área ( $D_a$ ) foi obtido pela contagem de pontos coincidentes sobre as estruturas consideradas ( $P_i$ ) e o número total de pontos existentes no retículo ( $P$ ), sendo adotada a seguinte regra ( $D_a = 100 \times [\sum P_i / \sum P]$ ). O total de pontos ocupados pelo alvéolo foi considerado 100%, sendo  $P_i$  estabelecido como percentual relativo a este, ocupado por cada uma das estruturas consideradas com os valores resultantes da contagem dos 3 cortes histológicos de cada animal. Posteriormente foi feito o teste de Shapiro Wilk para verificar se as variáveis apresentavam distribuição paramétrica, como as categorias caíram em normalidade e por se tratar de mais de duas categorias optamos pelo teste estatístico Oneway ANOVA e o pós teste Tukey para comparar os dados entre si, com significância  $P < 0,05$ .



**Figura 1:** Representação esquemática da análise histomorfológica. Em **(a)** retículo de integração (II ZEISS) sobreposto a um corte histológico formando um campo contendo 100 pontos equidistantes (10x10) e sua distribuição regular por 13 campos sobre o corte histológico em **(b)**, totalizando 39 campos nos 3 cortes histológicos do terço médio do alvéolo pós-exodontia.

### 3.4 Análise Molecular

Para as análises moleculares foram desprezadas as demais áreas da maxila sendo coletada apenas a região do alvéolo, fragmentadas com auxílio de um cinzel, transferidas para um tubo "eppendorf" contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA) e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA e análise da expressão gênica.

### 3.5 Extrações de RNA e Transcrição Reversa

A extração do RNA total dos fragmentos foi realizada por meio do reagente Trizol, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, EUA), na proporção de 1mL de Trizol para cada 1mg de tecido, agitado por 30 segundos e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1mL da suspensão foi adicionado 0,2m de clorofórmio (Sigma) e centrifugadas a 13000 RPM por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa (camada superior) foi transferida para um tubo novo, foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, agitado em vortex e incubado por 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitação do RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 13000 RPM por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi

descartado e o precipitado lavado em etanol 100 %. Para permitir a secagem das amostras os tubos foram invertidos sobre um papel de filtro e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir a contaminação das amostras). Para redissolver o RNA total, as amostras foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de RNase, sendo então as amostras armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 5µl foi utilizada para determinar a concentração de RNA/µl nas amostras, usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia Amersham Biosciences, EUA) o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, utilizando uma transcriptase reversa (Kit de transcrição reversa Superscript III, Invitrogen Life Technologies) e 5µg de RNA total; obtendo como volume final de reação 200µl Reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas utilizando a enzima Taq polimerase (GIBCO Life Tech.) no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). As condições básicas da reação são 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 2 minutos 72°C, acrescidos de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados. Os produtos de PCR foram submetidos eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata 0,2%.

### **3.6 Reações de PCR Array**

A análise quantitativa prévia da expressão gênica da região dos alvéolos do grupo WT, foi analisada por meio de reações de PCR Array (SABiosciences QIAGEN). De forma geral, esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras por meio de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro, juntamente com os demais reagentes do kit (SABiosciences - QIAGEN) foram misturados para a formação de um mix, contendo: 1250µl do tampão 2x SuperArray RT qPCR Master Mix 100µl de reação de síntese de

cDNA: 1250µl de água deionizada DNase/RNase free (invitrogen, Life Technologies). Na sequência foram adicionados 25µl desta mistura em cada poço da placa (96 poços) já contendo os pares de primers liofilizados. Em seguida, a reação de PCR em tempo real foi executada no aparelho da ABI7500 compreendendo basicamente 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e quarenta e cinco ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold - ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras). Possibilitando assim, a análise quantitativa da expressão do fator avaliado, utilizando-se o expressão do fator avaliado, utilizando-se o Software RT2 Profiler PCR Array Data Analysis (SuperArray), que basicamente utiliza a fórmula  $2^{(-DDCt)}$  para inicial normalização pela média geométrica do gene constitutivo (beta-actina) e posteriormente normalizados pelo grupo wt, sendo expressos como fold change em relação ao grupo controle. Genes apresentando valores de ciclo threshold (Ct) acima de 40 foram considerados não expressos. Para os ensaios de PCR Array foi utilizado um pool da região dos alvéolos dentários provenientes de camundongos WT (condições homeostáticas) dos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.



## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Análise histológica descritiva do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos**

#### **0 hora pós-operatório**

Os alvéolos dentais dos animais estavam preenchidos predominantemente por coágulo sanguíneo e alguns espaços vazios que caracterizavam um possível exsudato inflamatório e presença de alguns resquícios do ligamento periodontal (FIGURA 2).

#### **7 dias pós-operatório**

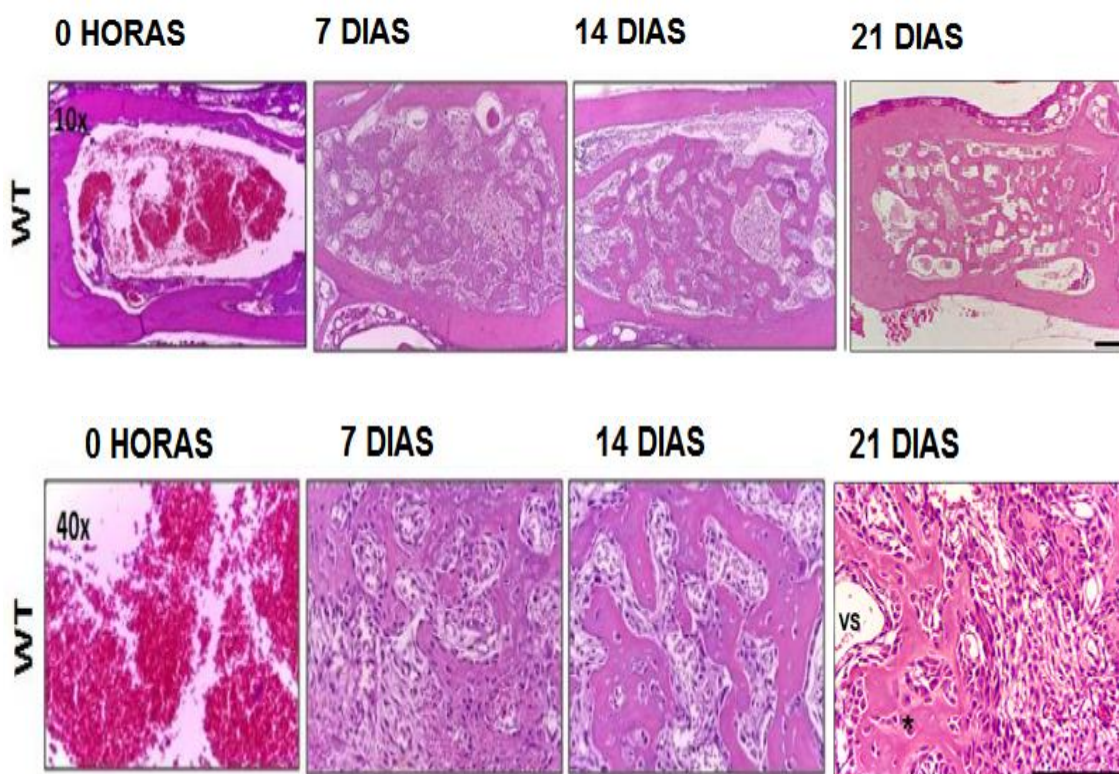
O alvéolo dentário encontra-se preenchido por tecido de granulação com pequenos vasos sanguíneos, fibroblastos e tecido conjuntivo desorganizado neoformado, com presença de pouco ou nenhum remanescente do coágulo sanguíneo, com um aumento do infiltrado inflamatório com presença de células polimorfonucleares e mononucleares distinguíveis em HE. Em algumas regiões foram observadas discretas trabéculas ósseas imatura, ricas em osteoblastos e osteócitos (FIGURA 2).

#### **14 dias pós-operatório**

Observaram-se uma proliferação de fibroblastos com disposição organizada no tecido conjuntivo ao lado de alguns linfócitos e plasmócitos, nesse momento teve uma intensa propagação de vasos sanguíneos e em alguns pontos verificou-se reabsorção óssea com presença de osteoclastos. Neste período houve um preenchimento ósseo parcial da porção central do alvéolo, com presença de trabéculas ósseas finas revestidas por diversos osteoblastos (FIGURA 2).

## 21 dias pós-operatório

Notou-se a finalização do processo de reparo dos tecidos do alvéolo dental, com considerável regressão das áreas ocupadas por tecido conjuntivo, além da presença de tecido medular permeando o tecido ósseo neoformado. Células com morfologia aparente de células de revestimento e outras com morfologia sugestiva de osteoblastos ativos foram notadas alinhadas ao redor das trabéculas ósseas (FIGURA 2).



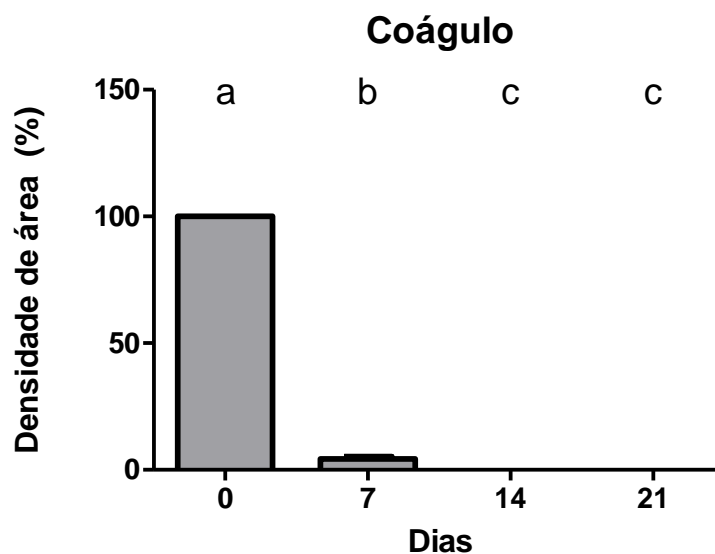
**Figura 2:** Fotomicrografia representativa do Grupo WT nos tempos de 0h, 7, 14 e 21 dias. Cortes histológicos foram obtidos provenientes dos alvéolos após exodontia do incisivo superior com a objetiva de 10x e 40x. (Coloração em H.E.; barra = 100  $\mu$ m).

### 4.2 Análise histomorfométrica comparativa do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camudongos

Para a análise quantitativa, as estruturas descritas foram previamente categorizadas dentro de diferentes parâmetros histológicos, tais como: coágulo sanguíneo, vasos sanguíneos e matriz óssea. Dessa forma,

cortes histológicos do terço médio do alvéolo dental dos camundongos foram corados em HE. Após, foram sistematicamente quantificados por meio de cálculo de densidade de área (%), permitindo assim uma análise comparativa dos eventos ocorridos durante os períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. Para organizar a disposição dos resultados de acordo com os tecidos observados na sequência do reparo, primeiro serão apresentados os resultados relativos ao coágulo sanguíneo, em seguida os resultados referentes aos parâmetros dos vasos sanguíneos e por fim, tecido ósseo.

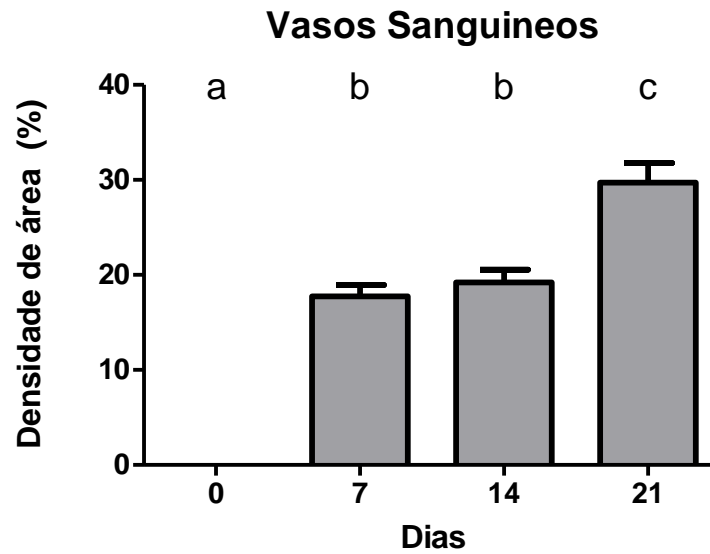
Em relação à densidade de área de coágulo sanguíneo, houve uma intensa densidade de coágulo no período de 0 hora, com diminuição significativa no 7º dia pós-exodontia e entre os dias 14 e 21 observa-se a ausência do coágulo ( $p < 0,05$ ; Figura 3).



**Figura 3:** Análise quantitativa de densidade de área de coágulo presente no alvéolo dental do grupo WT em 0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupo ( $p > 0,05$ ). One-way ANOVA com Tukey post-test.

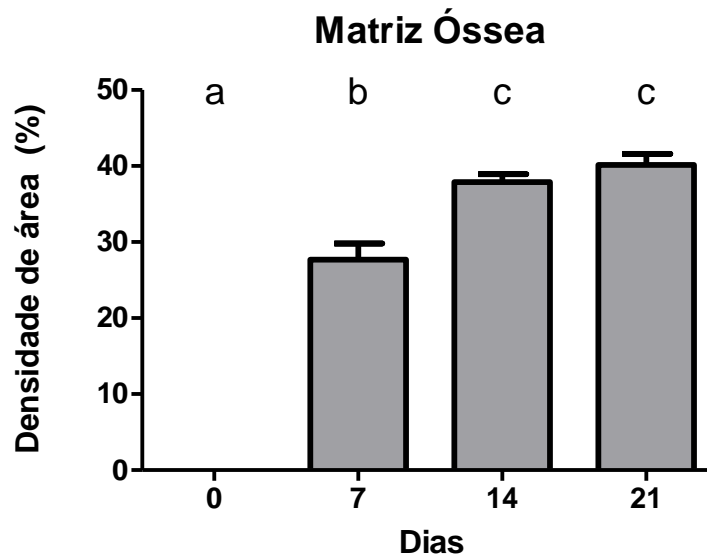
Analisando-se o gráfico dos vasos sanguíneos, pode-se observar que no período de 0 hora, não ocorreu formação de vaso e entre os dias 7 e 14 houve uma crescente produção de vasos com um aumento de densidade e uma constante na quantidade de vasos neste intervalo de tempo, após 21 dias ocorreu um crescimento com maior densidade de volume dos vasos

sanguíneos ( $p < 0,05$ : Figura 4).



**Figura 4:** Análise quantitativa de densidade de área de vasos sanguíneos presente no alvéolo dental do grupo WT em 0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupo ( $p > 0,05$ ). One-way ANOVA com Tukey post-test.

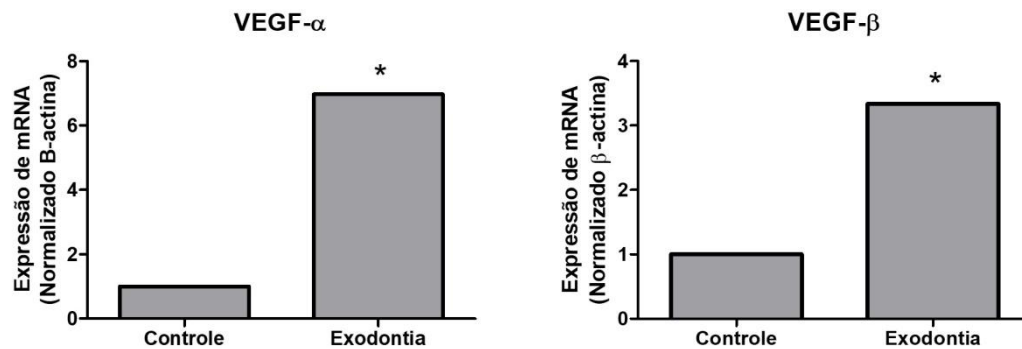
Na análise individual da matriz óssea, os camundongos mostraram uma crescente produção de osso a partir do 7º dia e entre os dias 14 e 21 ocorreu uma aumento de densidade em relação ao 7º dia e durante esse intervalo de tempo houve uma constante na densidade da matriz óssea ( $p < 0,05$ : Figura 5).



**Figura 5:** Análise quantitativa de densidade de área de matriz óssea presente no alvéolo dental do grupo WT em 0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupo ( $p > 0,05$ ). One-way ANOVA com Tukey post-test.

#### 4.3 Resultados das reações de PCR em tempo real

A análise molecular dos padrões de expressão gênica na cicatrização óssea foi composta por uma análise exploratória por matriz RealTimePCR, realizada com um conjunto de amostras de todos os períodos de tempo experimentais. Dessa forma, foi utilizado uma matriz personalizada de qPCR contendo um alvo pré-determinado que possivelmente está envolvido no processo de angiogênese, tal como: fator de crescimento VEGF. Assim, foi obtida uma média geral permitindo visualizar os alvos mais significativos a serem investigados de forma mais detalhada em análises posteriores. Verificamos a expressão de fatores de crescimento angiogênicos como o VEGF Alpha e Beta, e em nosso estudo o mesmo apresenta um pico de expressão no reparo ósseo pós-exodontia (Figura 6).



**Figura 6:** Análise quantitativa de densidade de área de fator de crescimento vascular endotelial no reparo ósseo alveolar após extração dentária. A análise molecular dos padrões de expressão genética na cicatrização óssea foi composta por uma análise exploratória inicial por um conjunto de RealTimePCR composto por amostras de todos os períodos de tempo experimentais (7d, 14d, 21d) no grupo (Exodontia). Os resultados apresentam os valores da média da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O processo de reparo ósseo e sua associação com o sistema imune vêm sendo estudado na osteoimunologia e, mesmo sabendo-se que o balanço entre resposta inflamatória e formação óssea é de extrema importância, tal interação é pouco compreendida (TAKAYANAGI, 2007). A maior parte dos trabalhos que avalia o reparo ósseo é estabelecido em modelo de fraturas, e esta situação mesmo apresentando algumas semelhanças não podem ser generalizadas a todos os reparos ósseos, pois os mesmos apresentam diversas particularidades, como: tipo de fratura, imobilização, processo de ossificação dentre outros (KUBOKI, *et al.*, 2003).

A influência do processo angiogênico no reparo ósseo alveolar escolhido como modelo de estudo corroboram com outros trabalhos, demonstrando que o crescimento, a remodelação e o próprio reparo ósseo requerem uma interação coordenada entre o organismo. A escolha do camundongo como animal de experimentação é explicada em decorrência da maior facilidade de aquisição e de alojamento bem como alta resistência a manipulação cirúrgica. Em relação às análises histológicas, o reparo ósseo alveolar em roedores é um excelente modelo de estudo, pois exhibe a sequência evolutiva similar ao homem (OKAMOTO; RUSSO, 1973; EMERY; SANDERSON, 1995).

Os camundongos utilizados apresentavam-se em condições homeostáticas, ou seja, com ausência de infecção ou inoculação de microrganismos. Entretanto a própria exodontia causa uma alteração na homeostasia tecidual. Quanto aos tempos experimentais, estes também foram definidos conforme padronização prévia em camundongos WT - C57Bl/6 (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013) considerando o tempo de 21 dias como um estágio de finalização do processo de reparo, em virtude da presença de tecido ósseo lamelar permeado por medula já nesta etapa, e pela maior quantidade de osso observada em relação aos tempos posteriores.

Conforme o resultado da análise histológica descritiva observou-se que após a exodontia, o alvéolo estava predominantemente preenchido por coágulo sanguíneo, resultante do rompimento dos vasos durante o

procedimento de extração, além de favorecer o tamponamento dos vasos tal processo inicia uma série de eventos celulares e moleculares que resultam gradualmente no estabelecimento do tecido de granulação e do processo inflamatório, de modo que o coágulo organizado serve como um arcabouço provisório para invasão de células constitutivas, leucócitos e novos capilares sanguíneos, além de contribuir inicialmente para a liberação de diversos fatores de crescimento e citocinas, oriundos de plaquetas ativadas (BURNOUNF *et al.*, 2013).

Como demonstrado no dia 7 iniciou-se uma neovascularização que desempenha importante papel na maturação de células pela ação de fatores de crescimento via *feedback* entre as mesmas. Essa complexa via de comunicação é dependente de citocinas e fatores de crescimento que são os reguladores do processo angiogênico que é essencial para o reparo ósseo.

Sendo que os estudos mostram que VEGF- $\alpha$  foi identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese atuando diretamente na formação durante o desenvolvimento, enquanto o VEGF- $\beta$  estar ligado à manutenção dos vasos. Em nossa pesquisa foi possível observar um pico de VEGF após a exodontia, tal fato demonstra a importância desse fator de crescimento para o processo de neovascularização, corroborando com achados na literatura (GALE, YANCOPOULOS, 1999). Esse é derivado do endotélio vascular e promove a vasodilação, induzindo a mitose de células endoteliais ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase, a ativação dos receptores TK é tipicamente iniciada pela ligação da molécula ativadora no sítio específico do domínio extracelular do receptor. Esta ligação induz uma dimerização dos receptores, resultando no processo de transdução do sinal, levando à proliferação e ampliação dos vasos nos tecidos, diferenciação, migração, metabolismo e morte celular programada (MANASH, KP; MUKHOPADHYAY AK, 2004).

A importância do VEGF na angiogênese foi evidenciada em estudos em camundongos, nos quais a deleção de ambos ou um único alelo do VEGF mostrou-se letal durante o desenvolvimento fetal devido à interrupção da angiogênese embrionária; sua expressão aumentada de maneira anormal também induz a morte fetal, devido à hiper-vascularização e por aumento da quantidade e do volume celular, proporcionando um aumento do tamanho dos



tecidos (STOUFFER, 2001; HANAHAN, 1997). Além disso, é possível observar na literatura que o VEGF estimula a produção de MMP que permite uma degradação da matriz facilitando a penetração dos vasos neoformados. Concomitantemente inicia-se a fase de neoformação óssea com discretas trabéculas ósseas imatura, ricas em osteoblastos e osteócitos.

No décimo quarto dia pós-operatório houve uma pequena proliferação dos vasos sanguíneos e a atividade osteogênica resultará em um tecido denso e fibroso eosinófilico rico em osteoblastos com fibras colágenas organizadas, promovendo uma ossificação intramembranosa, que tem início no centro de ossificação primário onde ocorre a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, esses participam da calcificação da matriz, por meio da secreção de vesículas compostas por fosfatase alcalina para o interior desta, no período em que a célula produz a matriz óssea. A fosfatase alcalina atua clivando o pirofosfato e inibe sua influência estabilizadora e ao mesmo tempo aumenta o fosfato local para cristalização, além desse processo as vesículas de Cálcio contribuem para calcificação do osteoíde. Quando este se mineraliza, engloba osteoblasto que virarão osteócitos e formará um sistema de canálculos, adquirindo um aspecto esponjoso, e com a intensa atividade mitótica, cria-se um ambiente de células osteoprogenitoras, e com a remodelação o tecido será substituído por tecido ósseo maduro ou lamelar (JONHSON, 2000).

A análise dos dados demonstra que o processo de reparo ósseo é semelhante aos obtidos por vários autores que estudaram o desenvolvimento do reparo alveolar, sendo que no último período aos 21 dias, foi verificado um tecido ósseo maduro caracterizado por trabéculas ósseas espessas e definidas e redução das áreas ocupadas por tecido conjuntivo, além da presença de tecido medular permeando o tecido ósseo neoformado (OKAMOTO; RUSSO, 1973).

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De acordo com a metodologia empregada e com resultados obtidos da avaliação histológica, fica claro que o reparo óssea alveolar em camundongos é um excelente meio de estudo para avaliar a cinética do reparo e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos. Nesse contexto vale ressaltar que o processo angiogênico é um fundamental autor para o desfecho da restauração do osso, pois o mesmo abriga fatores que desencadeiam a resposta imune inflamatória para modulação do reparo ósseo alveolar.

## 7 BIBLIOGRAFIA

AMLER, M.H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v.27,n.3 p.309-318;1969.

BABIC, A.M.; CHEN, C.C.; LAU, L.F. Fisp 12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cells adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis *in vivo*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 2958-2966, 1999.

BABIC, A.M.; KIREEVA, M.L.; KOLESNIKIVA, T.V.; LAU, L.F. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 6355-6360, 1998.

BIRN, H. Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis ("dry socket"). **Int J Oral Surg.** v.2, p.211-263;1973.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg.** v.117, n.7, 2006.

BROWN, L. F.; DETMAR, M.; CLAFFEY, K.; NAGY, J. A.; FENG, D.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. **EXS.** v.79, p.233-269; 1997.

BURNOUF, T. *et al.* Blood-derived biomaterials and platelet growth factoris in regenerative medicine. **Blood Rev** v. 27, p.77-89.

CARDOSO, L. C. Análise morfológica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. 2009.

CARREL, A. *The treatment of wounds*.**JAMA.** v.55, p.2148; 1910.

CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. Reparação do alvéolo dental In: Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica. São Paulo: **Panamericana**; p.55-80; 1987.

CHOI, B.M.; KWAK, H.J.; JUN, C.D.; PARK, S.D.; KIM, K.Y.; KIM, H.R.; CHUNG, H.T. Control of scarring in adult wounds using antisense transforming growth factor- beta 1oligodeoxynucleotides. **Immunol. Cell. Biol.** v. 74, p. 144-150, 1996.

CLARK R.A.F. Wound repair. In: Kumar, Robbins, Cotran: **Pathologic Basis of Disease**, 7th ed., Ed. Saunders. p.112. 2005.

CLARK, R.A.; Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **Am. J. Med. Sci**, v. 306, p. 42-48, 1993.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCROEN, F. J. **Patologia Estrutural e Funcional**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

CULLINAN-BOVE, K.; KOOS, R.D. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogeninduced increases in uterine capillary permeability and growth. **Endocrinology**. v.133, n.2, p.829-837; 1993.

ECKERSLEY, J. R. T.; DUDLEY, H. A. F. Wound and wound healing. **British Medical Bulletin**, v. 44, n. 2, p. 423-36, 1988.

EMERY, P. W.; SANDERSON. P. Effect of dietary restriction on protein synthesis and wound healing after surgery in the rat. **Clin Sci (Lond)**, v. 89, n. 4, p.383-388; 1995.

ENGELHARD, E.; TOKSOY, A.; GOOBELER, M.; DEBUS, S.; BRÜCKER, E. B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase- specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. **Am. J.Pathol.**, v.153, p. 1849-1860, 1998.

EULER, H. Heilung von extractions wunden: line tue experimentalle studie. Dtsch Mschr Zahnheilk. v.41, p.687-700; 1923.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Recent Prog Horm Res**. v.55, p.15-35, 2000.

GALE, N.W.; YANCOPOULOS, G.D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development. **Genes Dev**, v.13, p. 1055-1066, 1999.

HANAHAN, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. **Science**, v.277, p.48- 50; 1997.

HELDIN, C.H.; WESTRMARK, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. **Physiol. Rev**, v. 79, p. 1283-1316, 1999.

HUEBSCH, R.F. *et al.* The healing process following molar extraction: I. normal male rats. **J Oral Surg**, v.5, n.8, p.864-876; 1952.

HUTSON, J.M.; NIAL, M. EVANS, D.; FOWLER R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. **Nature**, v. 279, p. 793-795, 1979.

JACOBSSON, S.A.; DJERF, K.; IVARSSON, I.; WAHLSTROM, O. Effect of diclofenac on fixation of hydroxyapatite-coated implants. An experimental study. **J Bone Joint Surg Br**, v.76, n.5, p.831-833 1994.

JOHANSEN, J.R. Repair of the post-extraction alveolus in the wistar rat: a histologic and autoradiographic study. **Acta Odontol Scand**. v.28, n.4, p.441-461;1970.

JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica**. 2ª Ed., Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 502- 511, 2000.

KALYVAS, D.G.; TARENIDOU, M. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osseointegration. **J Oral Sci**. v.50, n.3, p.239-246; 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.928, 2013.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E.F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1553-1559, 1995.

LIN, W.L.; MCCULLOCH, C.A.; CHO, M.L. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. **Anat Rec**. v.240, n.4, p.492-506; 1994.

MANASH, K.P.; MUKHOPADHYAY, A.K. Tyrosine kinase: Role and significance in Cancer. **Int J Med Sci**,; v.1, p.101-115; 2004.

MICHAEL, G.; NEWMAN.; HENRY, T.; PERRY, R. KLOKKEVOLD.; FERMIN, A.; CARRANZA, J.R. **Carranza Periodontia Clínica – 11ª Edição – 2012**.

OKAMOTO, T.; RUSSO, M. C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev Fac Odont Araçatuba**, v. 2, n. 2, 1973.

RISAU, W. Angiogenic growth factors. **Prog. Growth Factor Res.**, v. 2, p. 71-79, 1990.

SIMPSON, H.E. The healing of extraction wounds. **Braz Dent J.** v.126, n.12, p.550-570; 1969.

STOUFFER, R. L.; MARTINEZ-CHEQUER, J. C.; MOLSKNESS, T. A. XU.; HAZZARD, M. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. **Archives of Medical Research** v.32, p.567-575; 2001.

TAKAYANAGI, H. Signaling mechanism in the regulation of osteoclast differentiation by the immune system. **Seikagaku**, v.75, n.12, p.1535-1540; 2003.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.; MORIYA, T. *Biologia da ferida e cicatrização.* **Medicina Ribeirão Preto.** v.41, n.3, p.259-264; 2008.

TROMBELLI, L.; FARINA, R.; MARZOLA, A.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. **J Clin Periodontol** v.35, p.630-690; 2008.

VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.43, n.6, p.415-422; 1999.

WAGNER, C. L.; MASCELLI, M. A.; NEBLOCK, D. S.; WEISMAN, H. F.; COLLIER, B.S.; JORDAN, R.E. Analysis of GP IIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*, v. 88, p. 907-914, 1996.